

**VERFAHREN ZUR EXPANSION POSTEMBRYONALER STAMM- UND
PROGENITORZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT UND IMMUNTHERAPEUTIKUM**

GEBIET DER ERFINDUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur ex vivo Expansion humaner post-embryonaler Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut. Insbesondere betrifft die Erfindung die Gewinnung, Vermehrung und Differenzierung von humanen postembryonalen Stamm- und Progenitorzellen zu immunkompetenten Zellen für deren Einsatz als Immuntherapeutika.

10 HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Verfahren zur Gewinnung und Züchtung von Stammzellen werden seit langem untersucht; siehe Punzel M et al, *The microenvironment of AFT024 cells maintains primitive human hematopoiesis by counteracting contact mediated inhibition of proliferation*, CELL COMMUNICATION & ADHESION (2002) 9, 149-159; Gupta P et al, *Human LTC-IC can be maintained for at least 5 weeks in vitro when interleukin-3 and a single chemokine are combined with O-sulfated heparansulfates: Requirement for optimal binding interactions of heparin sulfate with early-acting cytokines and matrix proteins*, BLOOD (2000) 95, 147-155; Gupta P et al, *Artificial proteoglycan-like molecules containing heparin sulfate enhance the ability of cytokines to maintain human hematopoietic stem cells in vitro*, JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE (1995) 43, 342A, & CLINICAL RESEARCH MEETING; SAND DIEGO; CALIFORNIA; USA; MAY 5-8, 1995; Gupta P et al., *Structurally specific heparin sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche*, BLOOD (1998) 92, 4641-4651; Lewis ID et al, *Umbilical cord blood cells capable of engrafting in primary secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system* BLOOD (2001) 97, 3441-3449; Moore K et al., *In vitro maintenance of highly purified transplantable hematopoietic stem cells*, BLOOD (1991) 89, 4337-4347; Moore K et al., *Hematopoietic activity of a stromal cell transmembrane protein containing epidermal growth factor like repeat motifs*, PNAS USA (1997), 94, 4011-4016; Stringer SE et al., *Identification of an MIP-lalpha-binding heparin sulfate oligosaccharide that supports long-term in vitro maintenance of human LTC-ICs*. BLOOD (2003) 101, 2243-2245).

Lewis ID et al. beschreiben in Blood (2001) 97, 3441-3449 ex vivo Kulturen mit und ohne Kontakt zu Stromazellen zum Langzeiterhalt und zur Züchtung (Expansion) angeblich

pluripotenter Zellen aus Nabelschnurblut. Die Nabelschnurblut-Stammzellen werden in kollagenbeschichteten Kulturschalen gezüchtet, wobei die Stammzellen über eine Membran hinweg in fluidem Kontakt mit AFT024-Feederzellen stehen. Die AFT024-Feederzellen geben offenkundig einen unbekannten Faktor ab, der bei der Expansion der Stammzellen 5 eine Arretierung der Differenzierung bewirkt. Ferner beschreiben sie Expansionskulturen in einem einheitlichen stromafreien MV8-Medium, das zusätzlich N-desulfatiertes O-sulfatiertes Heparin enthält. Die Kultur in dem stromafreien MV8-Medium mit dem N-desulfatierten O-sulfatierten Heparin erlaubt eine 180fache Expansion der TNC-Zellen, wobei aber die Vermehrung der CD34⁺-Zellen bzw. die CFC- und die LTC-IC-Expansion nur ein- bis 10 zweifach ist. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die Expansion der CD34⁺-Zellen im stromafreien MV8-Medium nach sieben Tagen nur das 1,1fache ($\pm 0,2$) ist und nach 14 Tagen nur das 2,0fache, bei einer Varianz von $\pm 2,0$ (!!) (siehe Tabelle 2, Seite 3444), so dass nicht von einer Expansion der CD34⁺-Zellen ausgegangen werden darf. So 15 vermehrte Stammzellen besitzen zudem nur mit Einschränkungen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur multilinearen Differenzierung zu myeloische und erythroide Zellen gemäß LTC-IC-Assay. So vermehrte Stammzellen können sich nicht zu lymphatische Zellen (NK- und NKT-Zellen) differenzieren.

Nachteilig am Stand der Technik ist somit, dass die Expansion der Stamm- und Progenitorzellen sehr gering ist und wegen der kleinen Zellzahlen so keine therapeutisch 20 applizierbaren Therapeutika hergestellt werden können. Ferner werden die Stamm- und Progenitorzellen nicht so vermehrt, dass sie danach noch zu immunkompetente lymphatische Zellen differenzieren können.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

25 Es ist Aufgabe der Erfindung, Verfahren und Mittel zur Expansion postembryonaler Stamm- und Progenitorzellen, vorzugsweise aus Nabelschurblut, bereitzustellen, das sich dadurch auszeichnet, dass nach ex vivo-Kultur und erfolgreicher Vermehrung sich die Zellen sowohl zu immunkompetente lymphatische NK- und NKT-Zellen als auch zu myeloische Progenitoren differenzieren können. Für den vorgesehenen Einsatz der Stamm- 30 und Progenitorzellen als Therapeutikum ist erforderlich, dass die ex vivo Kultur und Expansion ohne das Beisein von Stroma- und Feederzellen erfolgen.

Diese Aufgabe wird dadurch gelöst, dass die postembryonalen Stamm- und Progenitorzellen in einem Medium expandiert werden, das neben üblichen Nährstoffen ein 35 spezifisch regiomodifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, in dem

insbesondere in ein oder mehreren Monomereinheiten das C₂-Atom acyliert oder acetyliert ist und das C₆-Atom O-sulfatiert ist. Ein Aspekt der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Gewinnung und Expansion postembryonaler hämatopoietischer Stammzellen aus Nabelschurzblut unter Vermeidung von unerwünschter Differenzierung, wobei

5 Ausgangszellen aus Nabelschurzblut ex vivo in einem stromafreien Medium in Gegenwart eines regiomodifizierten Glycans und/oder Glycosaminoglycans gezüchtet werden, das so modifiziert ist, dass die Seitengruppe des C2-Atoms ein oder mehrere Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine Acetyl- oder Acylgruppe mit 2 bis 12 Kohlenatomen aufweist; die Seitengruppe des C6-Atoms ein oder mehrere

10 Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine 6-O-Sulfatgruppe ist und schließlich das Gewinnen von Stammzellen und Progenitorzellen, die zu myeloischen und lymphatischen Zellen differenzieren können. Das regiomodifizierte Glycan bzw. Glycosaminoglycan ist bevorzugt ausgewählt aus α 1-4 Glycane, β 1-3 Glycane, β 1-4 Glycane, β 1-3, β 1-4 Glycosaminoglycane, β 1-4, α 1-4 Glycosaminoglycane, β 1-4, β 1-3, (α 1-

15 3) Glycosaminoglycane und β 1-4, β 1-3, (α 1-4) Glycosaminoglycane. Das das regiomodifizierte Glycosaminoglycan kann ein Heparinderivat sein, das am C2-Atom im Wesentlichen N-desulfatiert und N-reacetyliert oder N-reacyliert wurde, das C6-O-Sulfatgruppen besitzt und das 5 Prozent oder weniger C3-O-Sulfat enthält. Besonders bevorzugt enthält das so regiomodifizierte Heparinderivat mindestens 60% C2-O-Sulfat und

20 mindestens 80% C6-O-Sulfat. Das regiomodifizierte Glycan oder Glycosaminoglycan liegt erfindungsgemäß in dem Kulturmedium in einer Konzentration von 15 bis 50 mg/L vor.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung liegt darin, dass die Stammzelleneigenschaften der so generierten Stammzellen und Progenitorzellen in einem ML-IC-Assay kontrolliert werden bzw in einem LY-IC-Assay und einem LTC-IC-Assay auf ihre lymphatischen oder myeloischen Eigenschaften. Die unter GMP-gerechten Bedingungen (GMP - *good manufacturing practice*) vermehrten Stamm- und Progenitorzellen können auch in funktionelle Lymphozyten (NK-Zellen und NKT-Zellen) differenziert werden.

Ein besonders wertvoller Aspekt der Erfindung betrifft eine therapeutische Zusammensetzung, die erfindungsgemäß gewonnene und vermehrte Stamm- und Progenitorzellen enthält, bevorzugt zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger, Exzipienten oder anderem Verdünnungsmittel, beispielsweise für eine intraperitoneale, intervenöse, intratekale oder andere Injektion.

Ein unmittelbarer Aspekt der Erfindung ist ferner ein Kulturmedium zur Expansion postembryonaler Stamm- und Progenitorzellen, das ein regiomodifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei die Seitengruppe des C2-Atoms ein oder mehrerer

Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans acyliert oder acetyliert ist, und die Seitengruppe des C6-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine 6-O-Sulfatgruppe ist, sowie die Verwendung derartig regiomodifizierten Glycane und Glycosaminoglycane zur Expansion postembryonaler

5 Stamm- und Progenitorzellen.

Das erfindungsgemäß hergestellte Therapeutikum kann direkt verabreicht werden und zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Viruserkrankungen, Hepatitis C, HIV, maligne Systemerkrankungen, akute Leukämien, chronische Leukämien, myeloproliferatives Syndrom (MPS), myelodysplastisches Syndrom (MDS), hochmaligne Non-Hodgkin-

10 Lymphome (NHL), niedrigmaligne NHL, Morbus Hodgkin, multiples Myelom, Mb. Waldenström, Histiozytosis X, Amyloidose und solide Tumore wie Analkarzinom, Astrozytom, Basaliom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Blasenkrebs, Bronchialkarzinom, Brustkrebs, Corpuskarzinom, CUP-Syndrom, Darmkrebs, Dünndarmtumore, Eierstockkrebs, Endometriumkarzinom, Gallenblasenkrebs, Gebärmutterkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Glioblastom, Hirntumoren, Hirnlymphome, Hirnmetastasen, Hodenkrebs, Hypophysentumor, Karzinoide, Kehlkopfkrebs, Knochenkrebs, Kopf-Hals-Tumore, Kolonkarzinom, Kranio-pharyngeome, Leberkrebs, Lebermetastasen, Lidtumor, Lungenkrebs, Magenkrebs, Medulloblastome, Melanom, Meningeome, Mycosis fungoides, Neurinom, Nierenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphome, Oligodendroliom, Ösophaguskarzinom, Ovarial-Karzinom,

15 Pankreaskarzinom, Peniskrebs, Prostatakrebs, Rachenkrebs, Rektumkarzinom, Retinoblastom, Scheidenkrebs, Schilddrüsenkarzinom, Speiseröhrenkrebs, Spinaliom, Thymom, Urethrakrebs, Vulvakerbs, Weichteiltumoren, Zervixkarzinom.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen und Aspekte der Erfindungen können den Ansprüchen, der Beschreibung und den Beispielen entnommen werden.

25

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

In der Beschreibung stehen „postembryonale Stammzellen“ für somatische Stammzellen, insbesondere für Stammzellen aus humanem Nabelschurblut. Mit „Ausgangszellen“ werden frisch aus dem Nabelschnurblut isolierte, nicht expandierte Stammzellen bezeichnet. Mit der Formulierung „unter Vermeidung von Differenzierung“ wird verstanden, dass bei der *in vitro* Kultur die Stammzellen numerisch zumindest erhalten bleiben. Die Stammzelleigenschaft der vermehrten Zellen wird im ML-IC-Assay, wie nachstehend noch näher beschrieben, kontrolliert und bestätigt. Die durch Proliferation generierten, expandierten myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen werden zudem

im LTC-IC-Assay (myeloisch) und LY-IC-Assay (lymphatisch) quantifiziert, wie unten noch beschrieben.

Ein Aspekt der Erfindung ist somit ein Verfahren zur *in vitro* Generierung immun-kompetenter Zellen (NK- und NKT-Zellen) durch Expansion postembryonaler Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschurblut. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass die Ausgangszellen unter Vermeidung von unerwünschter Differenzierung in einem Medium gezüchtet werden, das ein regio- und stereoselektiv modifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei die Modifikationen so sind, dass dieses Glycan N- und/oder O-gebundene Sulfat-, Amino-, Acetyl- und/oder Acylgruppen entlang der Polymerkette enthält.

10 Besonders bevorzugt ist in ein oder mehreren Monomereinheiten das C₂-Atom acyliert oder acetyliert und das C₆-Atom O-sulfatiert. Mit anderen Worten, bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Nabelschurblut-Ausgangszellen unter Vermeidung von Differenzierung so vermehrt, dass einerseits die Stammzellen mindestens erhalten bleiben und parallel dazu primitive myeloisch- und lymphatisch-determinierte Progenitorzellen generiert werden. Ziel bei der Vermehrung ist also, dass bei einer Zellteilung zwei Stammzellen folgen, von der zumindest eine mit Stammzellfunktion erhalten bleibt und die andere sich zu einen definierten Progenitor differenziert oder, im Fall einer asymmetrischen Teilung, eine Stammzelle und eine Progenitorzelle entstehen, wobei sich die letztere zu immun-kompetente NK- und NKT-Zellen differenzieren kann.

20 Dieser Effekt aus Stammzellerhalt beziehungsweise Stammzellvermehrung und Progenitorzellen-Generierung wird durch eine *in vitro* Kultivierung in einem Kulturmedium erreicht, das ein modifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei in ein oder mehreren Monomereinheiten das C₂-Atom acyliert oder acetyliert und das C₆-Atom O-sulfatiert ist. Heparinmoleküle bestehen in der Regel aus unverzweigten Ketten von sulfatierten Saccharidbausteinen, die vor allem Glucosamin, Glucuronsäure und Iduronsäure enthalten; sie besitzen unterschiedliche Molekulargewichte zwischen 4 000 und 50 000 Dalton. Das durchschnittliche Gewicht der Heparine liegt bei 16 000 Dalton. Aufgrund der vielen im Molekül vorkommenden Carboxyl- und Sulfatreste ist Heparin stark negativ geladen und bildet daher unter physiologischen Bedingungen Komplexe mit basischen Proteinen. Ist das erfindungsgemäß modifizierte Glycan bzw. Glycosaminoglycan ein Heparinderivat, so müssen die Glucosamineinheiten zu 80% oder mehr eine 6-O-Sulfatgruppe besitzen. Eine selektive 6-O-Desulfatierung des Heparinderivats verhindert drastisch die Differenzierungsarretierung bei der Stammzellexpansion. Die 2-O-Sulfatgruppe der Iduronsäureeinheiten ist ferner wichtig für die Differenzierungsarretierung.

30 35 Die 2-O-Sulfatgruppe sollte im Heparin zu 60% oder mehr vorhanden sein. Eine 2-O-De-

sulfatierung vermindert signifikant die Arretierungsaktivität. Die N-Sulfatgruppen an den Glucosamineeinheiten hingegen müssen entfernt und durch N-Acetyl oder N-Acylgruppen unterschiedlicher Länge, bevorzugt mit 3 bis 18 Kohlenstoffatomen, vorzugsweise 2 bis 12 und ganz besonders bevorzugt mit 3 bis 6 Kohlenstoffatomen ersetzt werden. Die N-Desulfatierung des Heparinderivats allein bewirkt keine Arretierungsaktivität. Im Heparinderivat sollten zudem die Glucosamine zu 5% oder weniger eine 3-O-Sulfatgruppe tragen. Das Molekulargewicht des modifizierten Heparinderivats liegt ideal bei ca. 10 kDa. Als Ausgangsquelle für die Produktion modifizierter Heparine kann Heparin aus intestinaler Schweine- oder aus Rindermukosa oder -niere verwendet werden. Erfindungsgemäß in Frage kommen ferner partialsynthetische Heparinoide aus Polysacchariden natürlichen Ursprungs. Der Fachmann kennt verschiedene weitere Quellen für Glycane, Glycosaminoglycane und sulfatierte heparinoide Polysaccharide, die nach entsprechender Modifikation vergleichbare oder äquivalente Strukturen aufweisen.

Nabelschnurblut ist eine vorteilhafte Quelle für somatische Stammzellen, denn gegen deren Verwendung bestehen kaum oder keine ethischen Bedenken. Zudem sind die humanen postembryonalen Stamm- und Progenitorzellen aus Nabelschnurblut ontogenetisch naiv und sehr unreif, was für die angestrebten therapeutischen Ziele von großem Vorteil ist. Der klinisch therapeutische Einsatz dieser Zellen war wegen der geringen Zellzahlen in den meisten zur Verfügung stehenden Nabelschnur-Transplantaten hauptsächlich auf pädiatrische Patienten mit einem Körpergewicht von weniger als 40 kg beschränkt. Mit den bekannten stromafreien *in vitro* Verfahren konnten diese Stammzellen nicht expandiert werden und es war nicht möglich, mit ihnen ausreichend Immun-Effektorzellen zu generieren. Hauptproblem war die Induktion unkontrollierter Differenzierungen bei gleichzeitigem Verlust von Stammzellen aus der eingesetzten Ausgangspopulation.

Die bisherigen Erfahrungen zeigten, dass das nach der Abnabelung in der Plazenta verbliebene und über die Nabelschnur gewinnbare kindliche Restblut (CB oder *Cord Blood*) in der Regel genügend primitive blutbildende Stammzellen (HSC) enthält, um nunmehr auch bei Erwachsenen – und nicht nur bei Kindern – eine hämatologische und immunologische Rekonstitution zu erreichen. Die Verwendung von CB zur Stammzelltransplantation bei Erwachsenen war bislang wegen der nicht ausreichenden myeloischen und lymphatischen Progenitorzellzahl und insbesondere der Naivität der Immunzellen medizinisch limitiert, da zu lange hämatologische Rekonstitutionszeiten die Mortalität gegenüber der Knochenmarktransplantation signifikant erhöhen. Dabei bietet gerade CB den Vorteil, eine sie große Population von primitiven Stammzellen mit erhöhter Proliferations- und Stammzellpotenz enthalten. In letzter Zeit haben mehrere Berichte nach-

gewiesen, dass Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut auch vorteilhaft bei allogenen Transplantationen von Patienten mit bösartigen Systemerkrankungen sind: Stammzellen aus Nabelschnurblut haben gegenüber solchen aus Knochenmark oder peripherem Blut entscheidende Vorteile: i) Sie sind schnell und unkompliziert ohne 5 körperliche Belastung eines Spenders zu gewinnen. ii) Es besteht ein deutlich geringeres Risiko für die Übertragung viral erkrankungen (insbesondere des Cytomegalie-Virus). iii) Das Risiko einer GvHD-Erkrankung (*graft versus host disease*) ist wesentlich geringer, so dass bei vergleichbaren Ergebnissen bis zu 10 HLA-Mismatches akzeptiert werden können. Nabelschnurblut-Präparate gibt es als sogenannte Fertigarzneimittel komplett vorgetestet und eingelagert und sie sind innerhalb kürzester Zeit verfügbar. Der therapeutische Einsatz für hämatologische Transplantationen war aber nicht nur wegen der geringen Zellzahl in den Transplantaten limitiert, sondern auch durch die lange Rekonstitutionsphase, welche entsprechenden klinischen Komplikationen nach der Transplantation zur Folge hatte. Diese Probleme werden durch das erfindungsgemäße Verfahren 15 und die damit bereitgestellten Immuntherapeutika behoben.

Die Aktivität der immunologischen Effektorzellen aus Nabelschnurblut ist im Vergleich zu adulten Quellen zwar stark reduziert. Dies ist aber auch vorteilhaft, da es zu einer geringeren Inzidenz und Schwere einer GvHD beiträgt. Andererseits ergibt sich daraus eine erhöhte Morbidität und Mortalität durch Infektionskomplikationen bei Nabelschnurstammzelltransplantationen. Diese Probleme werden aber gleichfalls durch die erfindungsgemäße ex vivo Generierung von immunkompetenten Zellen gelöst. 20

Es wurde in mehreren Studien gezeigt, dass insbesondere die NK-Zellen bei allogenen Transplantationen eine wichtige Rolle spielen, in dem die alloreaktiven Spender-NK-Zellen nicht nur residuale Leukämiezellen sondern auch T-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen des Wirtes abtöten und an der initialen Infektabwehr nach Transplantation teilhaben. Diese Immunreaktionen werden über Interaktionen sogenannter „Killer Immuno-globulin-like Rezeptoren“ (KIR-Rezeptoren) und sogenannter Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR) auf der Spender NK-Zelle mit bestimmten Antigenen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes der Klasse I (HLA Kl. I) auf den Wirtszellen gesteuert. 25

Aus diesen Gründen ist eine ex vivo Expansion mit nachfolgender funktioneller Ausreifung primitiver CB-Progenitorzellen, insbesondere mit Differenzierungspotenzial zu NK-Zellen, für eine erfolgreiche Stammzelltransplantation wichtig. Dazu müssen wenige primitive Zellen expandiert werden, so dass ausreichend Progenitorzellen zur Verfügung stehen, um dann durch weitere Ausdifferenzierung - unter anderem zu NK- und NKT-Zellen 30

35 - ein klinisch einsetzbares Therapeutikum zu generieren.

Bei der ex vivo Expansion humaner Stammzellen aus Knochenmark und CB wurden im Stand der Technik bislang unterschiedliche Kulturzusätze verwendet – unterschiedliche Kombinationen von Zytokinen, Stromazellfeederlayer, Bioreaktoren. Der Stand der Technik ist derzeit widersprüchlich oder vielfach nicht reproduzierbar. Es ist auch nicht klar, ob bei den beschriebenen ex vivo Kulturen zur Expansion der Zellzahl und zur Proliferationsinduktion die Stammzellen ihre Eigenschaften und Fähigkeit zur multilinealen Differenzierung und Selbsterneuerung beibehalten und zur Transplantation geeignet sind. Alle bisherigen *in vitro* Kultursysteme bewirken bei der Proliferation der Stammzellen gleichzeitig einen unkontrollierten Differenzierungsschub. Die alleinige Expansion der Zellzahl, phänotypischer Merkmale wie CD34 oder die Expansion von Progenitoren in liniendeterminierten Assays gibt keine Auskunft über die Stammzellen, ob diese nach noch zur regenerativen Selbsterneuerung und multilinealen Differenzierung fähig sind.

Die Schwierigkeit ist die Analyse der humanen Stammzellen im Allgemeinen und speziell der *in vitro* expandierten Stammzellen auf Zellzahl, Qualität und Differenzierungsgrad. Mehrere *in vitro* Assays sind etabliert, die primitive humane hämatopoetische Progenitorzellen analysieren: der Long-Term-Culture-Initiating-Cell(LTC-IC)-Assay und der „cobblestone area forming cell assay“ (CAFC). In Kombination mit dem „Limiting Dilution Assay“ (LDA) erlauben sie eine Aussage über die Häufigkeit von LTC-IC oder CAFC. Das Problem ist jedoch, dass nach einer expandierten *in vitro* Kultur diese Assays keine Aussagen zur multilinealen (*multilineage*), das heißt, zur myeloischen, lymphatischen, erythrozytären und thrombozytären Selbsterneuerungs- und Differenzierungskapazität der noch vorhandenen primitiven Stammzellen erlauben – was aber für die Untersuchung der Effektivität der *in vitro* Kultur wichtig ist. Die Zahl und Charakteristik humaner Stammzellen wird bisher in sehr aufwendigen xenogenen Tiermodellen überprüft (*in utero*-Schaf, NOD-SCID-Maus). Eine Charakterisierung der expandierten Stammzellen auf der Basis einer Zelloberflächenmarkeranalyse ohne gleichzeitige funktionelle Testung ist nicht ausreichend verlässlich. Es hat sich im NOD-SCID-Maus-Modell gezeigt, dass ex vivo expandierte humane Stammzellen zwar die für primitive Stammzellen typischen Oberflächenmarker trugen, jedoch in der SCID-Maus nicht mehr zur Selbsterneuerung fähig waren.

Es gibt aber bislang keine Berichte für eine gerichtete Expansion und Generierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut für den Einsatz als Therapeutikum. Es ist zwar bekannt, dass Komplexe von kationischem Chitosan und verschiedenen Glycosaminoglycanen, insbesondere Heparin und Chondroitinsulfat B als Festphase und unter Zusatz von Stammzellfaktor und IL-3 die Expansion von CD34⁺/CB-Zellen fördern können. Der Differenzierungsstand der CD34⁺-Zellen wurde aber nicht untersucht. Ferner war bekannt,

dass Heparansulfate, synthetisiert von bestimmten Stromazellen, das Wachstum und die Differenzierung primitiver humaner hämatopoetischer Knochenmarksstammzellen (KM-HSC) beeinflussen und dass solche KM-HSC ohne den Zusatz von Stromazellen nur in Gegenwart von bestimmten Glycosaminoglycanen *in vitro* für eine Zeitspanne von 5 Wochen bis maximal 80% erhalten werden können. Dabei wurde nur die 6-O-Sulfatierung des Heparins als das wesentliche strukturelle Element des Heparins beschrieben, welches diesen Effekt auslöst. Mit desulfatiertem-, N-sulfatiertem oder unmodifiziertem Heparin konnten die wachstumsfördernden Effekte nicht erzielt werden, was den spezifischen Effekt der erfindungsgemäßen Modifikationen unterstreicht. Es war zwar weiterhin bekannt, dass 10 6-O-sulfatierte Heparine ausschließlich myeloisch-determinierte Zellen (Langzeitkultur induzierende Zellen; LTC-IC) aus humanem Knochenmark bis zu 80% über 5 Wochen erhalten können. Eine Expansion des primitiven Stammzellpools erfolgte dabei aber nicht. Zudem wurde nicht untersucht, in wie weit derartige Heparine und Polysaccharide primitive 15 und multipotente hämatopoetische Stammzellen in bezug auf Zellwachstum und Differenzierung in therapeutisch wirksame Immunzellen beeinflussen. Die Erfindung beruht auf der überraschenden Entdeckung, dass bestimmte regiospezifischen Modifizierungen an Glycan und/oder Glycosaminoglycanen wie an Heparin bei der ex vivo Expansionskultur postembryональer Stamm- und Progenitorzellen aus CB die Differenzierung arretieren und somit eine nachfolgende Differenzierung in immunkompetente Zellen ermöglichen.

20 Das beanspruchte Verfahren erlaubt die Expansion primitiver postembryональer Stammzellen aus einer kleinen Zellzahl bei zumindest numerischen Erhalt der Stammzellen und paralleler Generierung und Expansion von myeloischen und lymphatischen Progenitorzellen. Die Stammzellen können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren *in vitro* so vermehrt werden, dass eine (Re)implantation der expandierten Zellen auch unter klinischen 25 Bedingungen sowohl für die Regeneration der Hämatopoiese als auch für den spezifischen Gewebs- und Organersatz angewendet werden kann. Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet, dass reproduzierbar durch gezielten Einsatz von regio- und/oder stereoselektiv modifizierten Glycanen die Stammzellpopulation im Nabelschnurblut zur Proliferation angeregt wird, bei der die multipotenten Stammzellen erhalten bzw. vermehrt 30 werden und durch Zellteilungen myeloisch und lymphatisch determinierte Progenitoren expandiert beziehungsweise generiert werden.

Durch die erfindungsgemäße Anwendung der Glycane bzw. Glycosaminoglycane in einem sogenannten „*in vitro* Stammzellkultursystem“ können therapeutisch einsetzbare Progenitorzellen aus postembryonalen Geweben expandiert bzw. generiert werden, die 35 sowohl bei der Nabelschnurbluttransplantation eingesetzt werden können als auch als

eigenständiges zelluläres Therapeutikum bei Tumorerkrankungen oder Viruserkrankungen (z.B. Hepatitis C oder HIV). Folgende Krankheitsentitäten kommen dabei in Betracht: maligne Systemerkrankungen, akute Leukämien, chronische Leukämien, myeloproliferatives Syndrom (MPS), myelodysplastisches Syndrom (MDS), hochmaligne

5 Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), niedrigmaligne NHL, Morbus Hodgkin, multiples Myelom, Mb. Waldenström, Histiozytose X, Amyloidose und solide Tumore wie Analkarzinom, Astrozytom, Basaliom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Blasenkrebs, Bronchialkarzinom, Brustkrebs, Corpuskarzinom, CUP-Syndrom, Darmkrebs, Dünndarntumore, Eierstockkrebs, Endometriumkarzinom, Gallenblasenkrebs,

10 Gebärmutterkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Glioblastom, Hirntumoren, Hirnlymphome, Hirnmetastasen, Hodenkrebs, Hypophysentumor, Karzinoide, Kehlkopfkrebs, Knochenkrebs, Kopf-Hals-Tumore, Kolonkarzinom, Kranioharyngeome, Leberkrebs, Lebermetastasen, Littumor, Lungenkrebs, Magenkrebs, Medulloblastome, Melanom, Meningeome, Mycosis fungoides, Neurinom, Nierenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphome,

15 Oligodendroglom, Ösophaguskarzinom, Ovarial-Karzinom, Pankreaskarzinom, Peniskrebs, Prostatakrebs, Rachenkrebs, Rektumkarzinom, Retinoblastom, Scheidenkrebs, Schilddrüsenkarzinom, Speiseröhrenkrebs, Spinaliom, Thymom, Urethrakrebs, Vulvakrebs, Weichteiltumoren, Zervixkarzinom.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Anwendung von definierten

20 Glycanen beziehungsweise Glycosaminoglycanen durch regio- und/oder stereoselektive Modifikationen (Abbau, Ankopplung) funktioneller Seitengruppen (z.B. Carboxyl-, Sulfat-, Acetyl-, Acyl-, Aminogruppen) z.B. an bekannte Glycangerüste (α 1-4 Glycane, β 1-3 Glycane, β 1-4 Glycane, β 1-3, β 1-4 Glycosaminoglycane, β 1-3, β 1-4, α 1-3 Glycosaminoglycane und β 1-4, α 1-4 Glycosaminoglycane). Diese Verbindungen sind

25 hinsichtlich (a) ihrer Molekülmasse, (b) ihres Sulfatierungsgrades und -musters, und (c) der Anzahl anderer vorstehend genannter funktioneller Seitengruppen und Verteilung der funktionellen Gruppen in der Monomereinheit und entlang der Polymerkette definiert.

Die Veränderungen der Seitengruppen zur erfindungsgemäßen Verwendung bestehen zum einen aus einer Modifikation einer Seitengruppe am C2-Atom der

30 Monomereinheit des Glycans bzw. Glycosaminoglycans, vorzugsweise Desulfatierung und Reacylierung oder Reacetylierung, so dass definierte Verhältnisse der Seitengruppen am C2 Atom entlang der Polymerkette entstehen. Zum anderen ist die Anwesenheit einer Seitengruppe mit negativer Ladung, vorzugsweise eine 6-O-Sulfatgruppe, am C6 Atom der Monomereinheit des Glycans bzw. Glycosaminoglycans eine sterische Voraussetzung für

35 das erfindungsgemäße Verfahren. Der Prozentsatz der insgesamt modifizierten

Seitengruppen am C2 und/oder C6 Atom hängt von der jeweiligen Modifikation ab und der für das erfindungsgemäße Verfahren günstigste Prozentsatz kann mittels der im nachstehenden Beispiel genannten Assays vom Fachmann leicht ermittelt werden.

Diese Verbindungen können als Zusatz in Expansions- und Differenzierungskulturen

5 postembryonaler Stammzellen für sämtliche klinische und industrielle Anwendungen verwendet werden. Einer der wesentlichen Vorteile der Erfindung liegt im Einsatz einzelner chemisch genau definierter Substanzen zur reproduzierbaren Expansion und Generierung postembryonaler Progenitorzellen

In den zu der vorliegenden Erfindung führenden Experimenten wurden primitive hämatopoetische Stammzellen *in vitro* unter Zusatz von erfindungsgemäßen Polysacchariden und definierten Cytokinen ohne die Kokultivierung mit Stromazellen oder anderen Feedezellen in ihrem ursprünglichen primitiven Zustand erhalten und gleichzeitig gerichtete Progenitorzellen generiert. Das Differenzierungspotential dieser Zellen wurde in anschließenden Kulturen auf Einzelzellebene nachgewiesen. Die eingesetzten Polysaccharide mit definierten funktionellen Gruppen zeichnen sich durch ihren definierten Anteil an 6-O-Sulfat- und N-Sulfatgruppen, 2-O- und 3-O-Sulfatgruppen, sowie N-acetyl bzw N-acyl Gruppen aus. Es handelt sich dabei um regio- und stereoselektiv sulfatierte und acetylierte/acylierte Wiederholungseinheiten von Polysacchariden mit unterschiedlich einstellbaren definierten Durchschnittssubstitutionsgraden für die einzelnen Gruppen. Durch 10 die Konstellation der jeweiligen Seitengruppen mit unterschiedlichem Charakter (hydrophil, z.B. $-SO_3^-$; hydrophob, z.B. -acyl) und definierter Verteilung entlang der Polymerkette werden die hydrophoben und hydrophilen Verhältnisse innerhalb des Glycans 15 beziehungsweise Glycosaminoglycans wesentlich verändert.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur selektiven Vermehrung postembryonaler Stammzellen unter Vermeidung von Differenzierung, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszellen in einem Medium gezüchtet werden, dass ein modifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei die Modifikation so ist, dass die ursprüngliche Seitengruppe des C2 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans modifiziert ist und die Seitengruppe des C6 Atoms einer oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine Seitengruppe mit negativer Ladung, vorzugsweise eine 6-O-Sulfatgruppe ist.

Vorzugsweise ist das Glycan und/oder Glycosaminoglycan ein α 1-4 Glycan, β 1-3 Glycan, β 1-4 Glycan, β 1-3, β 1-4-Glycosaminoglycan, β 1-3, β 1-4, α 1-3 Glycosaminoglycan und/oder β 1-4, α 1-4 Glycosaminoglycan. Bevorzugt ist das C2-Atom ein oder mehrerer Monomereinheiten desulfatiert und eine neue Seitengruppe ist am C2-Atom eingeführt,

vorzugsweise eine Acetyl-, Acyl- (vorzugsweise Butyl-), Amino- oder Carboxymethyl-Gruppe. Besonders bevorzugt ist eine Acetyl- oder Acyl-Gruppe. Unter Reacetylierung wird die Ankopplung einer Acetylgruppe an das C2 Atom der Monomereinheit verstanden.

Der vorteilhafteste Prozentsatz der jeweils modifizierten C2 und/oder C6 Atome
5 kann mittels der nachstehend beschriebenen funktionellen Assays bestimmt werden.

Bei den für die vorliegende Anmeldung verwendeten Kohlenhydrat-Grundstrukturen handelt es sich um Verbindungen wie sie von der „IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) definiert wurden (Eur. J. Biochemistry 10 126 (1982), 439-441) und beispielsweise von S.Dumitriu (Polysaccharides in Medical Applications, Marcel Dekker, 1996) sowie J.Lehmann (Kohlenhydrate, Chemie und Biologie, G.Thieme Verlag, 1996) beschrieben wurden. Dabei werden unter dem Ausdruck Glycane alle Oligo- und Polysaccharide zusammengefasst, die von ihrem sequentiellen Aufbau sowohl Homoglycane, bestehend aus einer Monosaccharidwiederholungseinheit, als auch 15 Heteroglycane, bestehend aus verschiedenen Monosaccharidwiederholungseinheiten, sein können.

Als Oligosaccharide/Polysaccharide werden Verbindungen zusammengefasst, in denen Monosaccharide durch glycosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Oligosaccharide und Polysaccharide mit repetitiven Saccharidsequenzen werden hier als 20 Glycane zusammengefasst. Der Begriff „Oligosaccharid“ bezeichnet Glycane, die aus 2 bis 10 Monosaccharideinheiten bestehen, während der Begriff „Polysaccharid“ alle Glycane umfasst, die aus mehr als 10 Monosaccharideinheiten bestehen.

Als Glycosaminoglycane werden Heteroglycane mit repetitiven Disaccharideinheiten jeweils bestehend aus einem Aminozucker und einer Uronsäure definiert, die sich 25 untereinander hinsichtlich ihrer Monosaccharideinheiten und ihrer glycosidischen Bindung unterscheiden.

Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren Glycane bzw. Glycosaminoglycane können unterschiedliche Verknüpfungs- und Verzweigungsgrade aufweisen, d.h. z.B. linear, verzweigt oder zyklisch (z.B. β -Cyclodextrin) sein. Hinsichtlich ihres 30 Molekulargewichts unterliegen die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendbaren Glycane bzw. Glycosaminoglycane keiner Einschränkung, allerdings ist offensichtlich die biologische Aktivität bei größeren Molekülen besser. Günstige Molekulargewichte liegen im Bereich von etwa 10 bis 35 kD oder darüber.

Der Fachmann kann mittels allgemein bekannter Verfahren, z.B. über klassische 35 Schutzgruppentechniken und/oder Festphasensynthese die für das erfindungsgemäße

Verfahren geeigneten Poly-/Oligosaccharide herstellen. Verfahren zum Entfernen bzw. Ankoppeln von Seitenketten, z.B. zur regio- und stereoselektiven Modifikation sind ebenfalls allgemein bekannt; siehe z.B. Baumann et al., Carbohydrate Res. 308 (1998), 391-388; 331 (2001), 43-57; Baumann et al., Carbohydrate Res. 337 (2002), 1297-1307, Baumann et al.,
5 Macromol. Chem. Phys. 201 (2000), 1950-1962; Deutsches Patent 4444445.1; Huppertz et al., In: Frontiers in Biomedical Polymer Applications (Eds. Ottenbrite, Chiellini, Cohn, MigliaFresi, Sunamoto), Band 2, Seiten 115-129, Technomic 1999; Grootenhuis et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995), 736-739; Westerduin et al., Bioorg. Med. Chem. 2 (1994), 1267-1280; Wessel et al., Carbohydr. Res. 204 (1990), 131-139; Matsuo et al., Carbohydr. Res. 241
10 (1993), 209-215; Kurita et al., Macromolecules 31 (1998), 4764-4769; Kariya et al., J. Biol. Chem. 275 (2000), 25949-25958; Du et al., Carbohydr. Res. 329 (2000), 17-24; und Groth und Wagenknecht, Biomaterials 22 (2001), 2719-2729.

Der Fachmann kennt auch geeignete Züchtungsverfahren und Medien, um post-embryonale Stammzellen kultivieren zu können; siehe z.B. DE 196 08 813 C2 oder EP-B1 0 15 695 351 bzw. das nachfolgende Beispiel. Der Fachmann kann auch anhand einfacher Versuche die optimale Konzentration des modifizierten Glycans bzw. Glycosaminoglycans für den gewünschten Zweck bestimmen. Das „Grundmedium“, das u.a. ein erfindungsgemäßes modifiziertes Glycan bzw. Glycosaminoglycan enthält kann jedes Medium sein, das üblicherweise für die Stammzellexpansion verwendet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßigen Mediums ist das „Grundmedium“, in dem u.a. ein erfindungsgemäßes Glycan bzw. Glycosaminoglycan enthalten ist, IMDM („Iscoves Modifiziertes Dulbeccos Medium“; Invitrogen). Die gewünschten Stammzellen werden in dem vorstehenden Medium unter geeigneten Bedingungen, gegebenenfalls unter (teilweiser) Erneuerung des Mediums in geeigneten Zeitabständen, gezüchtet. Geeignete Bedingungen, beispielsweise hinsichtlich geeigneten Behältern, Temperatur, relativer Luftfeuchte, O₂-Gehalt und CO₂-Gehalt der Gasphase sind dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise werden die Zellen in dem vorstehenden Medium unter den folgenden Bedingungen kultiviert: (a) 37°C, (b) 100% rel. Luftfeuchte, (c) 10% O₂ und (d) 5% bis 7% CO₂. Der Fachmann kann auch die gewünschte Steuerung der Differenzierung der tierischen Zellen anhand üblicher Kriterien (morphologische Kriterien, Anwesenheit bzw. Abwesenheit spezifischer Oberflächenproteine etc.; siehe dazu auch die Assays im nachstehenden Beispiel) überwachen.
20
25
30
35

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßigen Verfahrens betrifft die Isolierung und/oder Anreicherung und/oder selektive Vermehrung von post-embryonalen Stammzellen unter Verwendung eines 2-O-desulfatierten Heparins, N-

desulfatierten und/oder N-desulfatierten und reacetylierten Heparin enthaltenden Mediums. Dabei erfolgt die Züchtung bzw. Haltung der Zellen wie vorstehend bzw. in dem nachstehenden Beispiel beschrieben.

Der Fachmann kann anhand einfacher Versuche die für das erfindungsgemäße Expansionsverfahren geeigneten Konzentrationen der modifizierten Glycane bzw. Glycosaminoglycane ermitteln. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Expansionsverfahrens ist das modifizierte Glycan bzw. Glycosaminoglycan in einer Konzentration von 2 bis 50 mg/l im Kulturmedium vorhanden, wobei eine Konzentration von 10 mg/ml am meisten bevorzugt ist.

Für das erfindungsgemäße Züchtungsverfahren können folgende nicht-embryonale, humane Stammzellen verwendet werden: somatische Stamm- oder Progenitorzellen, wobei hämatopoetische Stammzellen bevorzugt sind. Der Fachmann kennt geeignete Quellen zur Gewinnung und zur Expansion dieser Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen können z.B. aus fötaler Leber, Nabelschnurblut oder Knochenmark erhalten werden, wobei die Gewinnung aus Nabelschnurblut für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt im Anschluß an die Züchtung ein funktioneller Nachweis der Stamm- und Progenitorzelleigenschaften. Die nachstehende Beispiele erläutert die Erfindung.

Beispiel 1 - Expansionskultur hämatopoetischer Progenitorzellen mittels modifizierter Heparine als Zusatz zum Züchtungsmedium.

Stammzellangereicherte Nabelschnurblutzellen wurden in einem definierten und klinisch applizierbaren Expansionssystem unter Zusatz erfindungsgemäßer Glycane mit Bestimmung der Expansion primitiver myeloischer als auch lymphatischer Progenitorzellen als Zeichen der Stammzellvermehrung (quantifizierbar als ML-IC; „Myeloid-Lymphoid-Initiating Cells“) für 5 Wochen kultiviert.

Das Kulturmedium bestand aus „Iscoves modifiziertem Dulbeccos Medium“ (Invitrogen, Karlsruhe) mit 12,5% fötalem Kälberserum und 12,5% Pferdeserum (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Dazu wurden die in Tabelle 1 beschriebenen, sterilisierten Glycane mit funktionellen Seitingruppen in einer Konzentration von 20 mg/l sowie folgende Zusätze supplementiert: 2 mmol/l L-Glutamin (Invitrogen), Penicillin (1000 U/ml), Streptomycin 100 U/ml (Invitrogen), 10⁻⁶ mmol/l Hydrocortison, 25 µM 2-U/ml, Mercaptoethanol-B, 10 pg/ml GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, WA), 250 pg/ml G-CSF (Amgen, Thousand Oaks, CA), 200 pg/ml SCF (Stem Cell Technologies), 50 pg/ml LIF (Stem Cell Technologies), 200 pg/ml MIP-1 alpha (Stem Cell Technologies), und 50 pg/ml

IL-6 (Stem Cell Technologies), 10 ng/ml Flt-3L und 10 ng/ml Thrombopoietin (Immunex Corp., Seattle, WA).

Die Kulturen wurden bei 37°C and 5% CO₂ mit 48ständigem Mediumwechsel für 5 Wochen erhalten, anschließend wurde die Expansion der stammzelläquivalenten multipotenten Zellen im ML-IC Assay (Nachweis von LTC-IC und NK-IC) ermittelt.

ML-IC-Assay: Zur Testung der Stammzelleigenschaften der ex vivo kultivierten Nabelschnurblutzellen wurde der ML-IC-Assay (Punzel et al., Blood 93 (1999), 3750-3756) verwendet. Die Zellen der Primärkulturen wurden durch mechanische Pipettierung gleichmäßig in Suspension gebracht und anschließend wurde der Inhalt jeder individuellen Primärkultur (200 µl) in 4 neue, bereits prätabillierte AFT024-stromaabhängige Sekundärkulturen gebracht (50 µl Primärsuspension pro Sekundärkultur), und zwar in der Art und Weise, dass jede der 4 Sekundärkulturen einer primären Einzelzelle sich in der gleichen Position in den neuen Microtiterplatten befand. Damit wurde gewährleistet, dass alle sekundären Progenitoren sich der primären Einzelzelle zuordnen lassen. Zwei der Sekundärkulturen wurden dabei unter myeloischen Bedingungen im sekundären LTC-IC-Assay über 5 Wochen kultiviert. Die anderen zwei Kulturen wurden unter lymphatischen *in vitro* Differenzierungsbedingungen ebenfalls für weitere 5-7 Wochen im LY-IC-Assay kultiviert und anschließend auf reife funktionelle NK-Zellen wie unten beschrieben untersucht.

LTC-IC-Assay (Gupta et al., Blood 95 (2000), 147-155): Frisch sortierte Einzelzellen (Tag 0) oder die gesamte Nachkommenschaft einer Einzelzelle (Tag 14) wurden in AFT024 Kulturen mit Langzeitkultur (LTBMC)-Medium (IMDM/12,5% FCS/12.5% Pferdeserum sowie Penicillin/Streptomycin und 10⁻⁶ mmol Hydrocortison) kultiviert (1 x Mediumwechsel alle 7 Tage). Nach 5 Wochen wurde das Medium entfernt und die Kultur mit semisolidem Methylzellulose-Medium (1,12% Methylzellulose, IMDM/30% FCS, 3IU/ml Erythropoetin, 7,5% zytokinhaltigem Überstand der Zelllinie 5637 ATCC HB-5) versehen. Einzelzellen mit der Fähigkeit sekundäre kolonieformende Zellen (CFC) zu generieren wurden per Definition als LTC-IC bezeichnet.

LY-IC Assay: Frisch sortierte Einzelzellen (Tag 0) oder die gesamte Nachkommenschaft einer Einzelzelle (Tag 14) wurden in AFT024 Kulturen in lymphatischem Differenzierungsmedium (DMEM/Ham's F 12-Medium 2:1 (V/V) mit 20% humanem hitzeaktiviertem AB-Serum sowie 20 mg/ml Ascorbinsäure, 50 µmol Selen, 25 µmol Mercaptoäthanol, 50 µmol Äthanolamin, 1000 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL-3 [nur am Tag 0], 10

ng/ml Flt-3L, 10 ng/ml SCF und 20 ng/ml IL-7) kultiviert. Nach 5-7 Wochen wurden alle Kulturen mit visuell objektivierbarer klonaler Zellproliferation durch mechanische Pipettierung geerntet und mittels FACS-Analyse auf reife NK-Zellen (CD56+/CD3-), NKT-Zellen (CD3+/CD56+) und auch Pro-B-Zellen (CD 19+/CD56-) untersucht.

5

Primär kultivierte Einzelzellen, die in der Lage waren sowohl LTC-IC als auch lymphatische Effektorzellen zu generieren, sind dann stammzelläquivalente ML-IC. Die Expansion der Nabelschnurblutzellen errechnet sich aus dem Verhältnis von unreifen LTC-IC und NK-IC vor und nach der Expansionskultur. Die Ergebnisse der vorstehenden

10 Untersuchungen sind in Tabelle 1 dargestellt.

TABELLE 1

Expansion	H0	H0-1	H1	H2	H3	H3-1	C1	C2
Myeloisch	1,0	0,9	3,9	10,7	11,8	4,1	0,3	2,0
Lymphatisch	1,0	1,1	15,2	11,7	12,4	5,0	7,4	7,7

HO: Standard unmodifiziertes Heparin mit geringem 3-O-Sulfatgehalt,
 15 H0-1 Standard unmodifiziertes Heparin mit erhöhtem 3-O-Sulfatgehalt
 (Ausgangsheparine für regioselektive Modifizierungen);
 H1: 2-O-desulfatiertes Standard Heparin, aus H0;
 H2: N-desulfatiertes Standard Heparin aus Heparin H0;
 H3: N-desulfatiertes und reacetyliertes Standard Heparin aus H0;
 20 H3-1: N-desulfatiertes und reacetyliertes Standard Heparin aus H0-1;
 C1: Chitosan N-Sulfatiert;
 C2: Chitosan N-desulfatiert und N-acetyliert.

Bei den Heparinen ist 2-O-Sulfat die Sulfatgruppe am C2 der Iduronsäureeinheit, 3-O-Sulfat die Sulfatgruppe am C3 der Glucosamineinheit, 6-O-Sulfat die Sulfatgruppe am C6 der Glucosamineinheit, 2-N-Sulfat und N-Acetat die N-Sulfat und N-Acetylgruppe jeweils am C2 der Glucosamineinheit. Das durchschnittliche Molekulargewicht der eingesetzten Heparine lag bei 10- 12 kDa.

Als Chitosan-Ausgangsmaterial wurde Chitosan aus Krabben von FLUKA mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa genommen und durch Hydrolyse in Fragmente von 29 kDa gespalten. Mit diesem hydrolysierten Ausgangs-Chitosan wurde keine Expansion der Stammzellkulturen erreicht (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die eigentliche Stammzellexpansion ergibt sich aus der kombinierten Erhöhung der myeloischen und lymphatischen Expansionsfähigkeit der in den oben beschriebenen Expansionsbedingungen manipulierten CB-HSC. Der Zusatz von regio- und stereoselektiv 5 modifizierten Glycanen zeigt im Vergleich zu den Kulturen mit unmodifiziertem Heparin (H0 und H0-1) einen signifikanten Expansionseffekt. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass für den durch modifizierte Glycane erzeugten Effekt auf die Expansion von CB- HSC eine Desulfatierung am C2-Atom mit Reacetylierung bzw. Acylierung verantwortlich ist.

TABELLE 2

Regioseletiv-modifiziertes Glycan	2-O-Sulfat	3-O-Sulfat	6-O-Sulfat	2-N-Sulfat	2-N-Acetyl	2-N-CH ₂ -COOH
H0	60%	5%	90%	90%	7%	-
H0-1	58%	33%	90%	88%	5%	-
H1	9%	6%	85%	90%	5%	-
H2	60%	0%	85%	0%	14%	-
H3	60%	5%	85%	0%	100%	-
H3-1	58%	33%	83%	0%	100%	-
C1	-	0%	70%	88%	12%	38%
C2	-	0%	0%	59%	41%*	0%

10

Tabelle II ist zu entnehmen, dass bei Heparinen erfindungsgemäß im Gesamt-polymer zu >80% eine 6-O-Sulfatgruppe an der Glucosaminmonomereinheit notwendig ist. Eine selektive O-6-Desulfatierung gemäß H.Baumann et al., Carbohydrate Res (1998) 308, 15 381-388 resultiert in einer drastischen Reduzierung der funktionellen Aktivität bei der Stammzellexpansion. Die 2-O-Sulfatgruppe der Iduronsäuremonomereinheit trägt ebenfalls zur Aktivität bei und sollte zu >60% des Gesamtpolymers vorhanden sein. O-2-Desulfatierung reduziert ebenfalls signifikant die Aktivität. Die N-Sulfatgruppe der Glucosaminmonomereinheit muss gänzlich eliminiert und ersetzt werden durch eine N-Acetyl oder N-Acylgruppe unterschiedlicher Länge. Die N-Desulfatierung allein gibt keine erhöhte Aktivität. Die 3-O-Sulfatgruppe der Glucosaminmonomereinheit sollte bei weniger als oder gleich 5% des Gesamtpolymers liegen. Das Molekulargewicht der modifizierten Heparine sollte ideal bei ca. 10 kDa liegen. Als Ausgangsquelle für die Produktion 20 modifizierter Heparine kann Heparin aus intestinaler Schweine- oder aus Rindermukosa acetyl oder -nire verwendet werden. Als Ausgangsmaterial für die Versuche diente 25 Heparin aus Rinderniere.

Natriumheparinat aus Schweinemukosa, reinst für Forschungszwecke geeignet, Aktivität 178,000 IU/g (SERVA, Heidelberg, Germany). Die übrigen Chemikalien waren, sofern nicht anders angegeben, reine Substanzen der Firmen Aldrich, Fluka oder Sigma.

5 Ein Beispiel für ein funktionell aktives modifiziertes Heparin ist ein N-desulfatiertes, N-reacetyliertes Heparin mit folgender Struktur.

Modifiziertes Heparin mit veränderter Sulfatierung und Acetylierung

Heparin	2-O-S	3-O-S	6-O-S	C2-N-S	N-Ac	O-Ac	NH2
	63 %	5 %	84 %	0 %	100 %	0 %	0 %

10

Die Charakterisierung der Heparinderivate erfolgte mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie bei 75 MHz. Die Signale wurden identifiziert gemäß B.Casu et al., Arzneimittelforschung 33, 135-142, 1983; E.A.Yates et al., Carbohydrate Res. 294, 15-27, 1996. Die Quantifizierung der verschiedenen Sulfatgruppen erfolgte gemäß Casu et al., Arzneimittelforschung 33, 135-142, 1983. Die Molekulargewichte wurden säulenchromatographisch bestimmt. Die Säulen wurden kalibriert mit Keratansulfaten definierter Molekulargewichte [H. Butz et al. J. Biol. Chem. 267, 34023408, 1992]. Regioselektive Modifizierung am C3 und C6 der Glucosamin-Monomereinheit, N-Acetylierung und N-Carboxymethylierung am C2 der Glucosamin-Monomereinheit erfolgten gemäß Baumann H und Faust V, *Regioselektive Modifikationen der Chitosane*, Carbohydrate Res. (2001) 331, 43-57.

Beispiel 2 - Herstellung eines Immuntherapeutikums

Zur GMP-gerechten (good manufacturing practice) Anwendung wurden vor 25 expandierte Zellen in Suspensionskultur weiter expandiert unter folgenden Bedingungen:

DMEM/Ham's 12-Medium 2:1 (V/V) mit 10% humanem hitzeinaktiviertem AB-Serum sowie 20 mg/ml Ascorbinsäure, 50 μmol Selen, 25 μmol Mercaptoethanol, 50 μmol Ethanolamin, 1000 U/ml IL-2, 10 ng/ml Flt-3L, 10 ng/ml SCF, 20 ng/ml IL-7, 10ng/ml IL-15 und 10 ng/ml IL-21) kultiviert. Nach 3 bis 4 Wochen wurden die Zellen durch mechanische 30 Pipettierung geerntet und mittels FACS-Analyse auf reife funktionelle NK-Zellen wie folgt untersucht:

a) durch durchflusszytometrische Analyse der vorhandenen Oberflächenantigene. Dabei wurden über Mehrfarbenanalyse die CD56 (N-CAM) und CD16 (FcR γ III) positiven, CD3-negativen Zellen als NK-Zellen definiert und diese auf ihre KIR- und 35 Aktivator Rezeptoren analysiert. Diese Zellen waren sowohl für spezifische KIR-Rezeptoren

CD158 (CD158a (KIR2DL1), b (KIR2DL3)) beziehungsweise CD94/CD159a (NKG2a) als auch für bestimmte Nkp-Aktivator-Rezeptoren positiv, so dass eine zelllytische NK-Zellaktivität über Bindung an die entsprechenden HLA Klasse I-Antigene auf der nativen Zielzelle als molekulare Voraussetzung der Zelllyse gewährleistet war.

5 b) Zusätzlich wurde die lytische Aktivität der generierten NK-Zellen direkt über einen Standard ^{51}Cr -Release Assay auf K562 Zellen als Zielzelle nachgewiesen. Die durch den Zusatz unterschiedlicher Polysaccharide generierten multipotenten Stammzellen zeigten im weiteren Differenzierungskulturverlauf keine qualitativen Unterschiede hinsichtlich der Expression der oben erwähnten Oberflächenantigene, der Unterschied war ausschließlich in der Zellzahl der expandierten Zellen zu sehen.

10 Alternativ können die expandierten Progenitoren auch *in vivo* zur Ausreifung gebracht werden durch zusätzliche subkutane Administration von IL-2 im Patienten (Miller et al., 2005)

15 Damit steht ein zelluläres Therapeutikum zur Verfügung, welches Patienten als Blutprodukt über eine Vene transfundiert werden kann. In dem zellulären Produkt sind die benannten expandierten Natürlichen Killerzellen bzw deren Progenitoren enthalten, die dann therapeutische Effekte beim Patienten hervorrufen. Diese sogenannten Natürlichen-Killer-Zell-Therapeutika (NKZT) können sowohl im Zusammenhang mit einer Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation appliziert werden als auch als eigenständige Therapeutika zur Behandlung von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden und lymphatischen Systemes, und sämtlicher anderer bösartiger Erkrankungen einsetzbar. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen ist die Passage der Bluthirnschranke, was auch den Einsatz bei allen bösartigen Hirntumoren ermöglicht.

20 Weiterhin ist auch ein Einsatz zur Behandlung von chronischer Viruserkrankungen (z.B. Hepatitis C und HIV) möglich.

Beispiel 3 - Produktion und Charakterisierung modifizierter Heparine

30 Gewinnung von Heparinen mit niedrigem 3-O-Sulfatgehalt mittels AT III-Affinitätschromatographie.

35 Anti-Thrombin III (AT III) bindet an eine spezifische Heparinsequenz, dessen Grundstruktur als ein Pentasaccharid mit einer 3-O-Sulfogruppe an einem inneren Glucosamin definiert ist, wobei die Sulfogruppe für die Bindung von ATIII unbedingt erforderlich ist (R.Linhard and I.Capila, Angew. Chemie 2002, 114, 426-450). Da erfindungsgemäß modifizierte Heparine einen sehr geringen Anteil an 3-O-Sulfogruppen an der Glucosamin-

monosaccharideinheit aufweisen müssen, wurde eine ATIII-Affinitätschromatographie auf einer Sepharose CL4B Säule angewendet, um im Durchlauf AT III nichtbindende Heparine für deren weitere chemische Modifikation zu erhalten. Das hierzu verwendete AT III wurde aus humanem Blutplasma isoliert.

5 Die Trennung von AT III-bindenden von den AT III-nichtbindenden Heparinen wurde über biomagnetische Separation kontrolliert. Dazu wurden magnetische AT III-Beads hergestellt, um in einer magnetischen Säule die AT III-bindende Fraktion der Heparine von solchen zu trennen, die kein AT III binden. AT III wurde mittels Biotin-X-NHS (Calbiochem) biotinyliert. Magnetische, mit Strepavidin benetzte Beads (Dynabeads M-270 Streptavidin; 10 Dynal) wurden in einem Verhältnis von 1 ml Beads auf 200 µg des ATIII Biotins eingesetzt.. Nach 30-minütiger Inkubation auf dem Rüttler wurden die Magnetobeads erneut in der Magnetsäule mit PBS gespült, um das ungebundene ATIII-Biotin zu entfernen. Die so gewonnenen ATIII-Magnetobeads konnten nun für den ATIII-Bindungs-Assay verwendet werden.

15

AT III-Bindungsassay.

Jeweils 1ml der ATIII-Magnetobeads wurde mit 1 ml des zu untersuchenden Heparansulfates bei Zimmertemperatur 30 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Das Gemisch wurde in einen Magnetständer gegeben, der Überstand mit dem ungebundenen Anteil 20 Heparansulfat abgehoben und die Heparansulfat-Konzentration photometrisch bei 232 nm ermittelt; hierzu wurden vorab für jedes Heparin Eichkurven erstellt. Der verbliebene, an die ATIII-Magnetobeads gebundene Anteil wurde nun 10 Minuten mit 2M NaCl auf dem Rüttler inkubiert und so die ATIII-Bindung gelöst. Dann wurde erneut im Magnetständer der Überstand mit dem Heparansulfat abgenommen, das im ersten Schritt an das ATIII gebunden 25 hatte. Dessen Konzentration wurde dann photometrisch bei 232 nm mittels der Eichkurve bestimmt.

Die so gewonnenen 3-O-Sulfat-armen Heparine würden dann nach etablierten Methoden partiell oder ganz modifiziert; siehe Nagasawa K et al., *Glucosamin N-desulfation*, Carbohydrate Res. (1977) 58, 47-55; Danishefsky, I et al., *Glucosamin N-reacetylation*, Arch Biochem Biophys (1960) 90, 114-121; M.Höök et al., *Glucosamin N-desulfation*, Anal Biochem. (1982) 119, 236-245, und wie vorstehend in Beispiel 2 beschrieben.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung und Expansion postembryonaler hämatopoietischer Stammzellen aus Nabelschurblut unter Vermeidung von erwünschter Differenzierung, wobei Ausgangszellen aus Nabelschnurblut *ex vivo* in einem stromafreien Medium in Gegenwart eines regiomodifizierten Glycans und/oder Glycosaminoglycans gezüchtet werden, das wie folgt modifiziert ist:
 - 5 die Seitengruppe des C2-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans weist eine Acetyl- oder Acylgruppe mit 2 bis 12 Kohlenatomen auf;
 - 10 die Seitengruppe des C6-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans ist eine 6-O-Sulfatgruppe, und Gewinnen von generierten Stammzellen und Progenitorzellen, die gezielt zu myeloischen und lymphatischen Zellen differenzieren können.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das regiomodifizierte Glycan bzw. Glycosaminoglycan ausgewählt ist aus: α 1-4 Glycane, β 1-3 Glycane, β 1-4 Glycane, β 1-3, β 1-4 Glycosaminoglycan, β 1-4, α 1-4 Glycosaminoglycan, β 1-4, β 1-3, (α 1-3) Glycosaminoglycan und β 1-4, β 1-3, (α 1-4) Glycosaminoglycan ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das regiomodifizierte Glycosaminoglycan ein Heparinderivat ist, das am C2-Atom im Wesentlichen N-desulfatiert und N-reacetyliert oder N-reacyliert wurde, das C6-O-Sulfatgruppen besitzt und das 5 Prozent oder weniger C3-O-Sulfat enthält.
- 25 4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das regiomodifizierte Glycosaminoglycan ein Heparin ist, das mindestens 60% C2-O-Sulfat und mindestens 80% C6-O-Sulfat enthält.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das regiomodifizierte Glycan oder Glycosaminoglycan in einer Konzentration von 15 bis 50 mg/L im Medium vorhanden ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Eigenschaften der Stammzellen in einem ML-IC-Assay kontrolliert werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Eigenschaften der generierten Progenitorzellen in einem LY-IC-Assay (lymphatisch) oder in einem LTC-IC-Assay (myeloisch-erythroid) oder in beiden Assays kontrolliert werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die unter GMP-gerechten Bedingungen (GMP - *good manufacturing practice*) vermehrten Stamm- und Progenitorzellen in funktionelle Lymphozyten (NK-Zellen und NKT-Zellen) differenziert werden.
9. Therapeutische Zusammensetzung, enthaltend Stamm- und Progenitorzellen, die gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 gewonnen sind.
10. Therapeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 9 sowie einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Exzipienten.
11. Kulturmedium zur Expansion postembryonaler Stamm- und Progenitorzellen, dadurch gekennzeichnet, dass es ein regiomodifiziertes Glycan und/oder Glycosaminoglycan enthält, wobei die Seitengruppe des C2-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans acyliert oder acetyliert ist, und die Seitengruppe des C6-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine 6-O-Sulfatgruppe ist.
12. Verwendung von regiomodifizierten Glycanen und Glycosaminoglycanen, wobei die Seitengruppe des C2-Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans acyliert oder acetyliert ist, und die Seitengruppe des C6 Atoms ein oder mehrerer Monomereinheiten des Glycans und/oder Glycosaminoglycans eine 6-O-Sulfatgruppe besitzt, zur Expansion postembryonaler Stamm- und Progenitorzellen.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Therapeutikums zur direkten Verabreichung von expandierten Stamm- und Progenitorzellen.

5 14. Verfahren nach Anspruch 13 zur Herstellung eines Therapeutikums zur Behandlung von Tumorerkrankungen, Viruserkrankungen, Hepatitis C, HIV, maligne Systemerkrankungen, akute Leukämien, chronische Leukämien, myeloproliferatives Syndrom (MPS), myelodysplastisches Syndrom (MDS), hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), niedrigmaligne NHL, Morbus Hodgkin, multiples Myelom, Mb. Waldenström, Histiozytosis X, Amyloidose und solide Tumore wie Analkarzinom, Astrozytom, Basaliom, Bauchspeichel-drüsengekrebs, Blasenkrebs, Bronchialkarzinom, Brustkrebs, Corpuskarzinom, CUP-Syndrom, Darmkrebs, Dünndarmtumore, Eierstockkrebs, Endometrium-karzinom, Gallenblasenkrebs, Gebärmutterkrebs, Gebärmutterhalskrebs, Glioblastom, Hirntumoren, Hirnlymphome, Hirnmetastasen, Hodenkrebs, Hypophysentumor, Karzinoide, Kehlkopfkrebs, Knochenkrebs, Kopf-Hals-Tumore, Kolonkarzinom, Kraniopharyngeome, Leberkrebs, Lebermetastasen, Lidtumor, Lungenkrebs, Magenkrebs, Medulloblastome, Melanom, Meningeome, Mycosis fungoides, Neurinom, Nierenkrebs, Non-Hodgkin-Lymphome, Oligodendrogiom, Ösophaguskarzinom, Ovarial-Karzinom, Pankreaskarzinom, Peniskrebs, Prostatakrebs, Rachenkrebs, Rektumkarzinom, Retinoblastom, Scheidenkrebs, Schilddrüsenkarzinom, Speiseröhrenkrebs, Spinaliom, Thymom, Urethrakrebs, Vulvakrebs, Weichteiltumoren, Zervixkarzinom.

25

* * *